

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE GOMA ARÁBIGA FRENTE A MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS EN LECHE

Virginia Gonzalez Estevez¹; María Laura Boiero¹; Mariana Angélica Montenegro^{1,2}

virginia_ge@frvm.utn.edu.ar

¹ Dpto de Ing. Química, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María, Argentina.

² Centro de Investigaciones y Transferencia Villa María (CITVM – CONICET), Universidad Nacional de Villa María, Argentina.

1. Resumen

La gran mayoría de los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y/o transporte sufren deterioros por la acción de microorganismos (MO) presentes en su matriz. Su desarrollo puede traer aparejada la producción de enzimas líticas termorresistentes, provocar modificaciones organolépticas (off-flavour) y la degradación de nutrientes valiosos, generando importantes pérdidas en la calidad del producto. La leche, rica en sustancias nutritivas y con una elevada a_w , resulta un medio susceptible al ataque microbiano. La refrigeración a bajas temperaturas, método ampliamente utilizado para prevenirlo, puede favorecer la selección de MO psicrótrofos. Existe una nueva tendencia a la preservación de los alimentos mediante el empleo de compuestos naturales (CN) biológicamente activos. Específicamente en la industria láctea, se adicionan CN con un rol tecnológico definido, como es el caso de Goma Arábica (GA), un polímero previsto como espesante/estabilizante por el Código Alimentario Argentino. El objetivo del presente trabajo fue evaluar, si GA grado alimentario (GAA) además de su función tecnológica, tiene actividad antimicrobiana (AAM). En particular, se determinó su capacidad para reducir la velocidad de crecimiento (μ) de MO psicrótrofos, tanto frente a una cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ (Pa), como a una cepa aislada de leche cruda e identificada genótipicamente como *Pseudomonas sp.* (Ps). Debido a que GAA tiene una pureza moderada, se estudia también GA de alta pureza (GAP) para comparar las propiedades de ambos compuestos. Se determinó la AAM a través de recuento en placa por triplicado en agar PCA. Los resultados obtenidos indican que GAA y GAP poseen AAM frente a ambos MO ejerciendo un efecto bacteriostático, siendo GAA más eficiente, lo que estaría demostrando una mayor funcionalidad del CN estudiado, con una potencial aplicación en la preservación de la leche.

2. Introducción

La gran mayoría de los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y/o transporte pueden sufrir deterioro por la acción de MO presentes en su matriz. Su desarrollo provoca alteraciones organolépticas (off-flavour) debido a la generación de compuestos volátiles (Karatapanis et. al., 2006; Kilcast y Subramaniam, 2000) y degradación de nutrientes (utilizados como sustratos) valiosos para la alimentación humana y necesarios para obtener buenos resultados en la elaboración de productos derivados del alimento afectado. La leche es una matriz compleja, rica en sustancias nutritivas, con

una elevada actividad de agua, factores que la convierten en un medio sumamente susceptible al ataque microbiano.

En la industria de alimentos en general y, en la industria láctea en particular, se emplean CN con un rol tecnológico definido como es el caso de GA, cuyo uso está previsto como espesante/estabilizante de productos lácteos en el CAA.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar una funcionalidad adicional de GAA, su capacidad antimicrobiana. Las tendencias mundiales hacia el reemplazo de los aditivos artificiales por los de origen natural, potencian el desarrollo de esta investigación. Paralelamente, debido a que GAA tiene una pureza moderada, se evalúa también esta propiedad en GAP de manera de poder comparar esta propiedad en ambos compuestos.

Debido a que, durante su transporte desde el tambo a la fábrica y una vez en ella, la leche se almacena a bajas temperaturas, el efecto de los compuestos antes mencionados se evalúa frente a un MO aislado de leche cruda, *Pseudomonas sp.* (Ps) y la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), ambos psicrótrofos. La elección de los MO a estudiar se llevó a cabo teniendo en cuenta que más del 50% de los aislamientos psicrótrofos de leche cruda pertenecen al género *Pseudomonas* (McKellar, 1989; Cousin, 1982; Chandler et al., 1985; Mc Phee et al., 2002). Además, cuando la leche cruda se almacena a 4 °C, *Pseudomonas sp.* puede producir suficientes proteasas como para hidrolizar toda la caseína disponible transformándola en péptidos solubles (Mc Kellar, 1989; Sørhaug et al., 1997) y constituye la preocupación principal con respecto a la degradación lipolítica de la leche (Shah, 1994; Mc Phee et al., 2002). En base a lo anteriormente expuesto, se propuso la determinación de la capacidad de los compuestos antes mencionados para reducir la velocidad de crecimiento (μ) de estos MO, empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad.

3. Materiales y Métodos

Compuestos naturales

Se estudiaron Goma Arábica Samspray 1 LQ (GAA) y Goma Arábica Purísima Biopack (GAP).

Microorganismos

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™) como cultivo de referencia.

Aislamiento y caracterización de MO de leche

El aislamiento de los MO a partir de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente concluido el ordeño), se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de la muestra, empleando Plate Count Agar (PCA) y agar Cetrimide (AC), un medio selectivo para el género *Pseudomonas*. Las placas fueron incubadas a 4 °C durante 10 días. Cultivos puros fueron obtenidos tras sucesivos

repiques en PCA. Se realizó además la caracterización morfológica y bioquímica preliminar de los aislamientos obtenidos mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa y oxidasa, etc. Ciertas cepas de interés fueron seleccionadas, para continuar con su caracterización genotípica.

Caracterización genotípica de los aislamientos

La extracción de ADN genómico de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía, crecidos en caldo nutritivo, empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA-Purification Kit (Promega, USA) según las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido se empleó como templado para la realización de los ensayos de biología molecular llevados a cabo en este estudio.

Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Se realizó la identificación genotípica mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. La región de interés se amplificó, a partir del ADN templado, empleando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACTT -3') (Weisburg et al., 1991). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron precipitados y purificados (DNA Clean and Concentrator-5, Zymo Research, USA) y posteriormente, fueron enviados para su secuenciación, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los electroferogramas obtenidos se analizaron y editaron manualmente (BioEdit Sequence Alignment Editor) para obtener las secuencias completas (1300-1500 pb) del gen 16S ARNr. Se analizaron las secuencias del gen 16S ARNr, con el objetivo de determinar el género y la especie más cercana, empleando la base de datos del Ribosomal Data Project (RDP), disponible en <http://rdp.cme.msu.edu/>, utilidad SeqMatch, y también, Basic Local Alignment Search tool (BLAST), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Los análisis fueron además, respaldados con el sitio List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), disponible en <http://www.bacterio.net/>.

Determinación de actividad antimicrobiana

Para determinar la curva de crecimiento de Pa (MO de referencia) y de Ps (aislado de leche cruda), con y sin la adición de los antimicrobianos GAA y GAP, se desarrolló la técnica de recuento microbiano con cada uno de ellos. A partir de un inóculo overnight (12 h) en caldo nutritivo, de cada microorganismo estudiado, se preparó un inóculo general, en un frasco con leche en polvo reconstituida en agua estéril, ajustando la concentración a una absorbancia de 0,002, a 600 nm, que equivale a 10^6 UFC/ml. Posteriormente, cada muestra se dividió en porciones iguales, a una de ellas se la reservó y, a las restantes, se les adicionaron los compuestos a estudiar. La proporción en las que fueron adicionados, corresponde a cinco veces las concentraciones permitidas por el CAA, con el objetivo de evaluar la efectividad en una concentración algo más elevada y, posteriormente, diluir la

leche adicionada, con leche fresca para alcanzar la cantidad permitida (5 g/l de GA). De esta manera, se logra que el inóculo inicial sea exactamente el mismo en la muestra con y sin antimicrobianos (AM). Las muestras se incubaron a 4° C durante 10 días. Cada 24 h, se realizó el recuento a través de siembra en profundidad (ICMSF, 2000). Para ello, se toma una alícuota de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo y, tras diluciones seriadas en agua peptonada estéril (0,1%), se siembra 1 ml en una placa estéril, a la que luego se adicionan 12 ml de PCA. Las placas se incubaron durante 48 h a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y graficándolos en función del tiempo. La μ , (h^{-1}) de cada cultivo microbiano en leche, se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente (crecimiento exponencial) de las curvas de crecimiento del MO, con y sin agregado de AM.

El porcentaje de reducción del crecimiento microbiano (%R) ejercido por los compuestos estudiados, fue calculado a través de la Ecuación 1.

$$\%R = \frac{\mu - \mu'}{\mu} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde μ y μ' , son las velocidades de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia del compuesto estudiado, respectivamente.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en Cabina de Seguridad Microbiológica Biohazard Clase II (BIO-II-A) bajo flujo laminar. Además todos los materiales usados en los experimentos fueron previamente esterilizados.

4. Resultados y Discusión

Aislamiento e identificación de MO de leche

De los MO que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C (psicrótrofos), fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología anteriormente expuesta. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron caracterizadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, filancia y pruebas bioquímicas. De ellos, fue seleccionado un bacilo corto Gram negativo, catalasa y oxidasa positivos, identificado preliminarmente como Ps, hipótesis respaldada por su crecimiento selectivo en AC.

Como se indicó inicialmente, para confirmar la identificación de género se empleó la utilidad Classifier de RDP (a través de sus aplicaciones Classifier y Seqmatch) y para la identificación de la especie más probable se empleó la base de datos RDP. La identificación genética confirmó que el MO aislado corresponde al género propuesto. Según la utilidad Classifier de la base de datos RDP, la cepa aislada seleccionada pertenece al dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, género Pseudomonas y fue específicamente identificado como *Pseudomonas sp.*, con alta probabilidad de corresponder a la

especie *Pseudomonas aeruginosa* (Nº de acceso: X3; AY631240) con un 100,0% de similitud, según RPD.

Determinación de actividad antimicrobiana

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de Pa a 4° C en leche, con y sin la adición de GAA y GAP. La Figura 2, corresponde a las mismas gráficas, pero para Ps. En todos los casos puede observarse una disminución de la velocidad de crecimiento de los MO con la adición de los compuestos estudiados, siendo más efectiva GAP.

Resulta importante destacar que, más allá de la reducción de μ , como puede apreciarse en la Figura 2.a., cerca de las 150 h, GAA comienzan a generar una fase de latencia, mientras que el MO, en ausencia de ella, continúa en fase exponencial, esto resultaría en un recuento microbiano final menor. GAP resultó particularmente efectiva frente a Pa generando un %R del 37%.

En la Tabla 1, se muestran las velocidades de crecimiento calculadas a partir de las curvas antes mencionadas. Allí puede verse que todos los compuestos presentan AAM. La unidad de concentración empleada es g/l debido a que, al trabajar con un aditivo grado alimentario, no se conoce su peso molecular y, esa es la unidad que se utiliza en el CAA para indicar los límites permitidos. Por otro lado, para poder llevar a cabo una comparación más apropiada, se utilizó la misma cantidad de GAP.

Teniendo en cuenta que GAA no es un compuesto puro y que se la emplea actualmente con un propósito tecnológico completamente distinto al que se está evaluando, el %R provocado por su presencia, es importante. Por otra parte, los mayores %R encontrados para GAP resultan lógicos si se tiene en cuenta que el compuesto bioactivo se encuentra en una mayor proporción.

Discusión

Los resultados de las curvas de crecimiento evidencian que GA ejerce un efecto bacteriostático frente tanto a MO de referencia como aislados de leche cruda, causando una reducción de la velocidad de crecimiento, sin provocar su inhibición, lo cual concuerda con numerosos estudios sobre la capacidad antimicrobiana de CN. Además, como se mencionó anteriormente, GAP presenta una mayor AAM que GAA, lo que se relaciona directamente con la concentración del compuesto bioactivo.

La AAM mostrada puede atribuirse a enzimas como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en su fracción proteica. Se han demostrado las propiedades antimicrobianas de algunas de estas enzimas (Tyler et al., 1977; Kirtikar et al., 1984).

Para que los AM alcancen su diana o sitio de acción, deben atravesar la cubierta bacteriana. Las bacterias Gram negativas, como Pa y Ps ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, ya que poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de péptidoglucano. Por ello, en las bacterias Gram positivas, el límite de exclusión es mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos (Calvo et al., 2009). Esto indicaría que GA tendrían

una AAM aún mayor a la obtenida en este estudio, frente a bacterias Gram positivas lo que abre el panorama para futuras investigaciones.

5. Conclusiones

Se demostró que GA, en las dos versiones estudiadas, tienen una importante AAM frente a los MO analizados si se tiene en cuenta que se la adiciona durante el procesamiento de leche con una funcionalidad tecnológica completamente distinta a la que se investigó en este estudio. Este hecho resulta sumamente relevante desde el punto de vista tecnológico considerando que una sencilla modificación en el momento en el que se adicionan los CN podría traducirse en un beneficio tecnológico adicional. En la actualidad, GAA se incorpora a la leche una vez que ha sido tratada térmicamente y que se ha definido el producto a elaborar. Lo que se propone, es adicionarla inmediatamente después del ordeño, en un múltiplo de las cantidades permitidas (se evaluó una concentración cinco veces mayor) en la leche cruda, cuyo destino sea un producto lácteo definido, de manera de conocer estas cantidades y poder diluirla posteriormente para alcanzar los límites admitidos pero habiendo potenciado su capacidad. La GAA ejercería su AAM en el tambo, el transporte y el almacenamiento refrigerado en la planta procesadora, previamente al tratamiento térmico. La disminución en la μ de los microorganismos psicrótrofos reduciría su número y, por ende, la cantidad de enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas. Esto se traduciría en un menor número de nutrientes dañados, valiosos tanto para la nutrición humana como para la obtención de mayores rendimientos en la elaboración de productos lácteos derivados.

Los resultados obtenidos, junto a la actitud del consumidor actual frente a los compuestos sintéticos, potencian la aplicación de aditivos de origen natural frente a los artificiales, también permitidos con la misma funcionalidad tecnológica que el evaluado, pero que no presentan esta ventaja adicional de proteger la calidad microbiológica del alimento e, indirectamente, su calidad nutricional.

6. Referencias

Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27, 1, 44-52.

Chandler, R.E.; McMeekin, T.A. 1985. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. *Australian Journal of Dairy Technology*. 40, 37-41.

Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*. 45, 172-207.

ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods, of the international union of microbiological societies). 2000. *Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición. ISBN: 84-200-0908-3.

Karatapanis, A. E.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. 2006. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*. 16: 750–761.

Kilcast, D., Subramaniam, P. 2000. Introduction. In D. Kilcast, & P. Subramaniam (Eds.). *The stability and shelf-life of food* (pp. 1-19). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

Kirtikar, K.R., Basu, B.D. 1984. *Indian medicinal plants*. (2nd ed.). Delhi, Periodical Expert Book Agency. 3, 1596 -1598.

McKellar, R.C. 1989. *Enzymes of psychrotrophs in Raw Food*, CRC Press

Mc Phee, J.D., Griffiths, M.W., 2002. Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas* spp. In: Roginsky, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 2340–2351.

Shah, N.P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*. 49, 432-437.

Sørhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Review Article. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 2, 35 - 41.

Tyler, V., Brady, L., & Robbers, J. 1977. *Pharmacognosy*. 7th ed (p. 66–80). Philadelphia: Lea & Febiger.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173, 2, 697-703.

7. Tablas y Figuras

A continuación se presentan las figuras y tablas mencionadas en el texto.

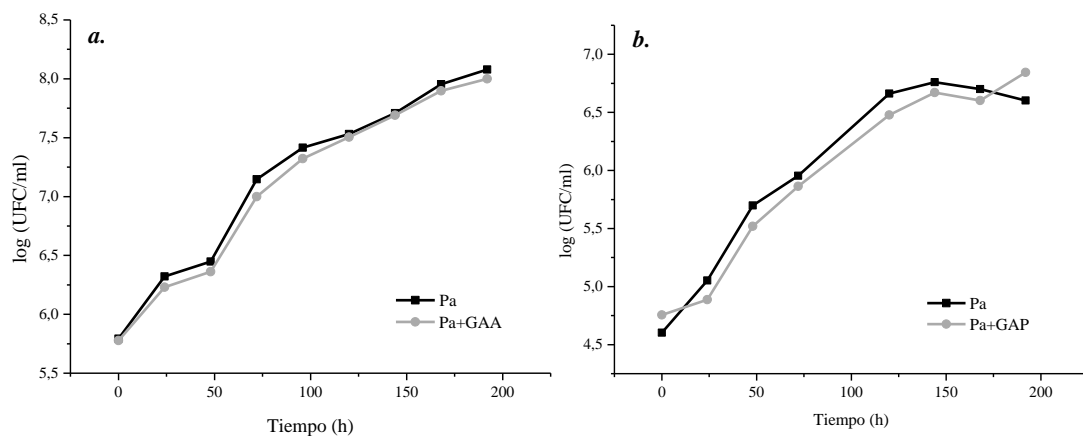


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Pa* en leche a 4° C con y sin adición de **a.** GAA y **b.** GAP

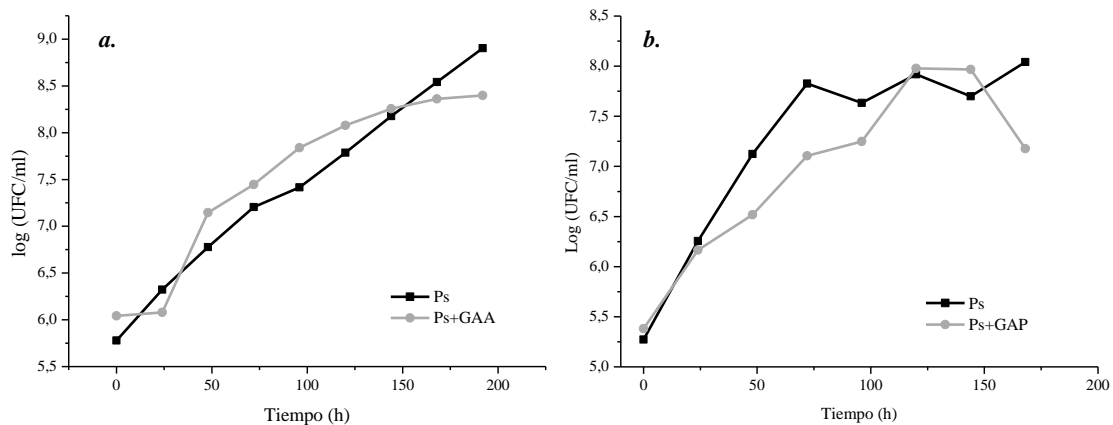


Figura 2. Curvas de crecimiento de Ps en leche a 4° C con y sin adición de **a.** GAA y **b.** GAP

Tabla 1. μ y %R de Pa y Ps en leche con y sin agregado de GAA y GAP

Compuesto	Concentración (g/l)	Pa		Ps	
		μ (h ⁻¹)	%R	μ (h ⁻¹)	%R
GAA	0	0,043 ± 0,003	-	0,034 ± 0,002	-
	25	0,039 ± 0,002	12	0,029 ± 0,002	15
GAP	0	0,037 ± 0,004	-	0,073 ± 0,001	-
	25	0,023 ± 0,002	37	0,055 ± 0,001	24